

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2002年12月 5日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2002-353649

[ ST.10/C ]:

[ JP 2002-353649 ]

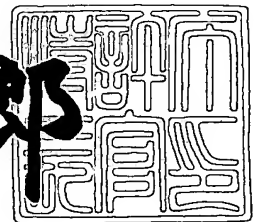
出 願 人  
Applicant(s):

呉羽化学工業株式会社

2003年 6月27日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3051228

【書類名】 特許願

【提出日】 平成14年12月 5日

【整理番号】 0701009001

【あて先】 特許庁長官 殿

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【国際特許分類】 C07D  
A61K

【発明者】

    【住所又は居所】 岡山県岡山市津島中 1 - 2 R E 3 0 6

    【氏名】 高畑 京也

【特許出願人】

    【識別番号】 000001100

    【氏名又は名称】 呉羽化学工業株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100097456

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 石川 徹

【選任した代理人】

    【識別番号】 100102923

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 加藤 雄二

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 094216

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】      要

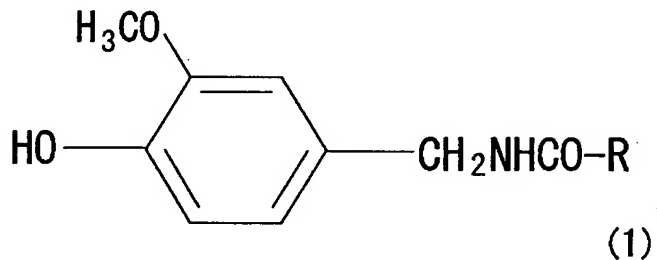
【書類名】 明細書

【発明の名称】 バニリル脂肪酸アミドを含む抗腫瘍医薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記化学式(1)で表されるバニリル脂肪酸アミドを含む、抗腫瘍医薬組成物：

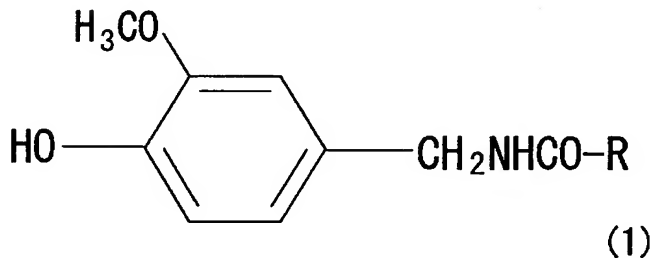
【化 1】



式中-CO-R基は、炭素原子数 1 4 個～3 2 個の飽和脂肪酸残基、又は炭素原子数 1 4 個～3 2 個の不飽和脂肪酸残基である。

【請求項 2】 下記化学式(1)で表されるバニリル脂肪酸アミドを含む、抗メラノーマ医薬組成物：

【化 2】



式中-CO-R基は、炭素原子数 1 4 個～3 2 個の飽和脂肪酸残基、又は炭素原子数 1 4 個～3 2 個の不飽和脂肪酸残基である。

【請求項 3】 該-CO-R基が、炭素原子数 1 4 個～3 2 個の飽和脂肪酸残基からなる群から選ばれたものである、請求項 1 又は 2 記載の医薬組成物。

【請求項 4】 該-CO-R基が、ミリスチン酸残基(C14)、パルミチン酸残基(C16)、及びステアリン酸残基(C18)からなる群から選ばれたものである、請求項

3 記載の医薬組成物。

【請求項 5】 該-CO-R基が、炭素原子数 1 4 個～3 2 個の不飽和脂肪酸残基からなる群から選ばれたものである、請求項 1 又は 2 記載の医薬組成物。

【請求項 6】 該-CO-R基が、二重結合を 1、2 又は 3 個有する炭素原子数 1 8 個の不飽和脂肪酸残基、及び二重結合を 4 又は 5 個有する炭素原子数 2 0 個の不飽和脂肪酸残基からなる群から選ばれたものである、請求項 5 記載の医薬組成物。

【請求項 7】 該-CO-R基が、オレイン酸残基(C18:1)、リシノール酸残基(C18:1)、リノール酸残基(C18:2)、リノレン酸残基(C18:3)、及びエレオステアリン酸残基(C18:3)からなる群から選ばれたものである、請求項 6 記載の医薬組成物。

【請求項 8】 該-CO-R基が、アラキドン酸残基(C20:4)及びエイコサペンタエン酸残基(C20:5)からなる群から選ばれたものである、請求項 6 記載の医薬組成物。

【請求項 9】 該-CO-R基が、二重結合を 4 個以上有する炭素原子数 2 2、2 4、2 6、2 8 及び 3 2 個の不飽和脂肪酸残基からなる群から選ばれたものである、請求項 5 記載の医薬組成物。

【請求項 1 0】 該-CO-R基が、4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸残基(C22:6)である、請求項 9 記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗腫瘍医薬組成物に関する。特に、本発明は、抗メラノーマ、及び抗白血病細胞増殖抑制作用を有する抗腫瘍医薬組成物に関するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

現在、ガン治療には、外科的療法、放射線療法、化学療法が行われており、該化学療法では、従来より直接腫瘍細胞に作用して腫瘍細胞を死滅させる薬剤を投与する治療法が広く適用されている。この種の療法に使用できる数多くの抗腫瘍

剤が知られているが、従来の化学療法に使用する薬剤は、腫瘍細胞を死滅させると共に、正常細胞にも作用するため、癌の治療効果は高いが、副作用が非常に強いという問題があった。

#### 【0003】

一方、香辛料として広く利用されているトウガラシの辛味成分、カプサイシン(8-メチル-N-バニリル-6-ノネンアミド)は、強い辛味を有し、かつ食欲増進作用、血管拡張・収縮作用、エネルギー代謝亢進作用、生理活性ペプチドの放出亢進作用など、生体に好ましい作用を有することで知られているが、近年、これらの好ましい生理作用に加えて抗腫瘍作用が報告されている(D.J. Morre et. al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 1831-1835 (1995)、及びK.Takahata et. al, Life Science, 64, PL 165-171 (1999))。すなわち、カプサイシンは、ヒト由来のHela細胞(子宮頸部癌細胞)や、HL-60細胞(急性前骨髄性白血病細胞)などの各種腫瘍細胞に対し、低濃度で増殖抑制作用があり、また、生き残った細胞の多くに核の分断や凝集などのアポトーシス様の変化を誘導するが、一方、ヒトの乳腺上皮及びラットの肝・腎などの正常細胞には増殖抑制効果がなく、その作用は腫瘍細胞に特異的であることが見出されている(D.J. Morre et. al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 1831-1835 (1995))。したがって、カプサイシンは、副作用が少なく、かつ有効な抗腫瘍剤として期待されるようになっている。

しかし、カプサイシンには強い辛み、刺激性、及び炎症誘発作用などがあるため使用し難く、また継続的に投与すると身体に負担となるという欠点がある。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、カプサイシン同様に低い副作用で、かつ高い抗腫瘍作用を有し、かつ強い辛さ、刺激性、及び炎症誘発性などが少ない、カプサイシン関連成分のバニリル脂肪酸アミド化合物を含む抗腫瘍医薬組成物を提供することを目的とする。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

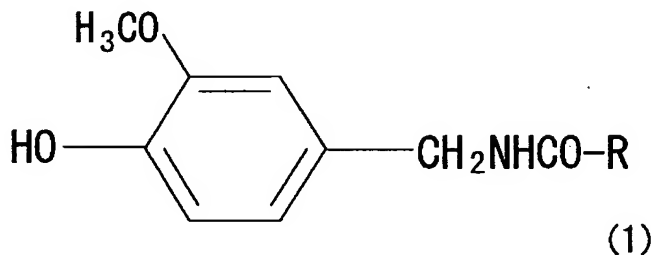
本願発明者は、カプサイシンの8-メチル-6-ノネン酸残基を、炭素原子数

が 1 4 個以上のアシル基（ $-CO-R$ 基）に置換したバニリル脂肪酸アミドは、カプサイシンの辛み、刺激性などが少なくなること、及びそのバニリルアミン構造にカプサイシンの生理作用発現に必要な生体内レセプターであるバニロイドレセプターに結合するという知見(A. Szallasi et.al., Life Sci., 47, 1399-1408 (1990))に基づき、研究を行なった。その結果、本発明者は、カプサイシン同様に低い副作用で、かつ抗腫瘍作用、特に高い抗メラノーマ作用及び抗白血病細胞作用を有し、かつ辛さ、刺激性、及び炎症誘発性などが低いカプサイシン関連成分のバニリル脂肪酸アミド化合物が得られるという知見を得て、本発明を完成した。

## 【 0 0 0 6 】

したがって、本発明は、下記化学式(1)で表されるバニリル脂肪酸アミドを含む、抗腫瘍医薬組成物：

## 【化 3】

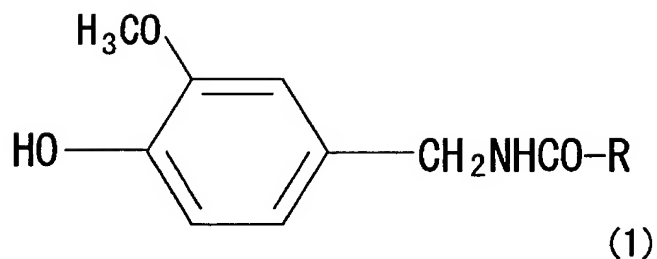


（式中 $-CO-R$ 基は、炭素原子数 1 4 個～3 2 個の飽和脂肪酸残基、又は炭素原子数 1 4 個～3 2 個の不飽和脂肪酸残基である。）を提供する。

## 【 0 0 0 7 】

また、本発明は、下記化学式(1)で表されるバニリル脂肪酸アミドを含む、抗メラノーマ医薬組成物：

【化 4】

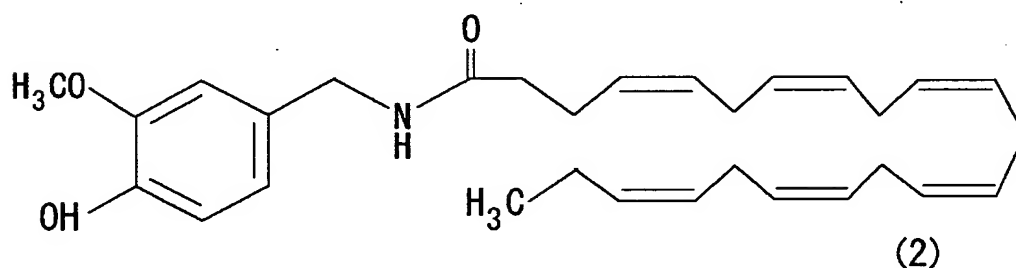


(式中-CO-R基は、炭素原子数 1 4 個～3 2 個の飽和脂肪酸残基、又は炭素原子数 1 4 個～3 2 個の不飽和脂肪酸残基である。) を提供する。

【0 0 0 8】

さらに、本発明は、下記化学式(2)で表されるバニリル脂肪酸アミドを含む、抗メラノーマ医薬組成物を提供する。

【化 5】



該バニリル脂肪酸アミドは、バニリルアミンと、4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸(C22:6, DHA)とがアミド結合した化合物であり、本発明者によりドヘバニル(Dohevanil)と命名されている。

なお、本明細書において「腫瘍」という語は、上皮細胞及び非上皮細胞のいずれかが変異した悪性腫瘍を意味し、造血幹細胞が腫瘍増殖する白血病を含むものである。

【0 0 0 9】

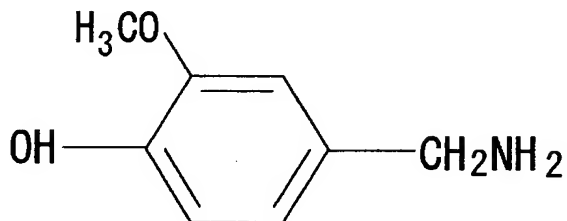
【発明の実施の形態】

本発明の抗腫瘍医薬組成物の主成分であるバニリル脂肪酸アミドは、前記式(1)に示されるように、下記化学式(3)で表されるバニリルアミンと、炭素原子数 1



4 個～3 2 個の飽和脂肪酸、又は炭素原子数 1 4 個～3 2 個の不飽和脂肪酸とがアミド結合した化合物である。

【化 6】



(3)

【0 0 1 0】

前記飽和脂肪酸は、直鎖飽和脂肪酸、又は飽和分枝脂肪酸のいずれであってもよい。該直鎖飽和脂肪酸の例を挙げると、ミリスチン酸(C14)、パルミチン酸(C16)、ステアリン酸(C18)、アラキン酸(C20)、ベヘン酸(C22)、リグノセリン酸(C24)、及びペンタデシリック酸(C26)などがあり、好ましくはミリスチン酸(C14)、パルミチン酸(C16)、及びステアリン酸(C18)である。また、該分枝飽和脂肪酸の例を挙げると、イソミリスチン酸(C14)、イソパルミチン酸(C16)、イソステアリン酸(C18)、及びイソアラキン酸(C20)などがある。

【0 0 1 1】

前記不飽和脂肪酸のうち好ましいものは、二重結合を1、2又は3個有する炭素原子数 1 8 個の不飽和脂肪酸、二重結合を 4 又は 5 個有する炭素原子数 2 0 個の不飽和脂肪酸、二重結合を 4 個以上有する炭素原子数 2 2、2 4、2 6、2 8 又は 3 2 個の不飽和脂肪酸である。

該不飽和脂肪酸の具体的な例を挙げると、ミリストレイン酸(C14:1)、パルミトレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:1)、リシノール酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、 $\alpha$ -又は $\beta$ -リノレン酸(C18:3)、エレオステアリン酸(C18:3)、アラキドン酸(C20:4)、エイコサペンタエン酸(C20:5)、及び4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸(C22:6)などがある。これらのうち好ましいものは、オレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、 $\alpha$ -又は $\beta$ -リノレン酸(C18:3)、エレオステアリン酸(C18:3)、アラキドン酸(C20:4)、エイコサペンタエン酸(C20:5)、及び4,7

,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸(C22:6, DHA)である。

【 0 0 1 2 】

本発明で用いるバニリル脂肪酸アミドの製造は、バニリルアミン塩酸塩と脂肪酸塩化物とを反応させて合成する方法、リパーゼの触媒作用によりカプサイシンのアシル基と、所望の脂肪酸又はそのエステルの置換反応を利用する方法(特開平11-206396号及び特開2000-14393号)、及び動植物由来の原料から抽出する方法などで行なうことができる。

【 0 0 1 3 】

該リパーゼの触媒作用を利用する方法を用いる場合、原料の脂肪酸エステルは、アルコール成分がグリセリンである脂肪酸エステル、すなわちグリセリドのモノエステル、ジエステル、トリエステル又はこれらの混合物でもよく、動植物由来の天然油脂を使用することができる。例えば、該天然油脂には、アマニ油、オリーブ油、カカオ油、トウモロコシ油、ゴマ油、ベニバナ油、小麦胚芽油、ヒマシ油、ヤシ油、落花生油、ヒマワリ油、綿実油、大豆油、サメ油などがある。

【 0 0 1 4 】

該方法で用いるバニリルアミンとしては、市販の合成品、トウガラシからの抽出カプサイシン、他のN-バニリル脂肪酸アミドの加水分解により得られたものを使用することができる。また、該方法で用いるリパーゼは、グリセリドの加水分解用酵素として市販されているリパーゼ、リパーゼを主成分とする複合酵素製剤、又はリパーゼ産生能を有する微生物の培養液であり、これらを固定化酵素の形態で使用してもよい。

【 0 0 1 5 】

該酵素反応は、無溶媒、又はリパーゼを失活させない疎水性有機溶媒(例えば、ヘキサン)中に行なう。バニリルアミンの反応率を高くするため、バニリルアミンに対して当量比で約30～1000倍の脂肪酸またはそのエステルを存在させるとよい。反応温度、水相のpH等の反応条件は、用いるリパーゼにとって最適な条件に選定すればよいが、一般的な反応温度は5～80℃、pHは4～11である。生成したN-バニリル脂肪酸アミドは、反応系から常法により分離することができる。

## 【 0 0 1 6 】

本発明のバニリル脂肪酸アミドの投与量は、投与経路、患者の性別、症状、年齢、体重に合わせて適宜変えることになるが、通常、成人一日当り 1 0 ～ 5 0 m g / k g 体重、特に 2 0 ～ 3 0 m g / k g 体重である。本発明の医薬組成物では、有効成分として前記バニリル脂肪酸アミドを単独で、又は他の抗腫瘍剤、その他の所望の薬剤との組み合わせで使用することができる。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の医薬組成物は、経口投与又は非経口投与することができる。該非経口投与には、点滴、静脈注射、皮下注射、筋肉注射などの注射による投与、軟膏及び経皮剤による経皮的投与、座剤による直腸投与などの形態がある。また、経口投与する場合、硬カプセル剤、軟カプセル剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、丸剤、トローチ錠、有効成分持続的開放剤、液剤、懸濁剤などの形態で調剤することができる。該調剤は、製薬分野で用いられている常法により容易に行なうことができる。

## 【 0 0 1 8 】

本発明の医薬組成物を経口投与形態に調剤する場合、通常の薬剤に汎用されている製剤用成分、例えば、充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤などの希釈剤、及び賦形剤などを用いることができる。具体的な例を挙げると、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸などの賦形剤、水、エタノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドンなどの結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖などの崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油などの崩壊抑制剤、第 4 級アンモニウム塩、ラウリル硫酸ナトリウムなどの吸収促進剤、グリセリン、デンプンなどの保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩等の滑沢剤などである。さら

に必要な応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤などを配合してもよい。

#### 【0019】

本発明の医薬組成物を経皮剤、例えば、皮膚塗布剤の形態に調剤し、皮膚組織に発生した腫瘍、特にメラノーマの治療に用いることができる。また、本発明で用いるバニリル脂肪酸アミドは鎮痛・鎮痒効果もあるので、該経皮剤は腫瘍、その他の疾患に伴う皮膚の痛み、痒みを止めるにも有用である。

本発明の医薬組成物を皮膚塗布剤として調剤する場合、該バニリル脂肪酸アミドカプサイシンは、該皮膚塗布剤に対し、5重量%以上であることが好ましく、20重量%以下であることが好ましい。

#### 【0020】

該皮膚塗布剤は、炭素数1～4の直鎖または分枝鎖のアルキル基を有する1価のアルコールの低級アルコールが含有されていることが好ましく、また、皮膚への密着性を向上させるため被覆剤を加えてもよい。該被覆剤の例を挙げると、酸化亜鉛、酸化チタン、酸化アルミニウム、酸化マグネシウム、酸化ジルコニウム、炭酸マグネシウム、硫酸バリウム、ヒドロキシアパタイト、ケイ酸マグネシウム、マイカ、カオリン、モンモリロナイト、ベントナイト、無水ケイ酸、ステアリン酸亜鉛、シリコーン樹脂、シルクパウダー、ポリエチレン粉末、キチン、キトサン、コラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸、アルギン酸セルロースなどがある。また、必要な応じて、界面活性剤、清涼剤などを加えてもよい。

次に、本発明を実施例等によりさらに詳細に説明する。なお、該実施例等は本発明を説明することを目的とし、本発明の範囲を限定するものではない。本発明の範囲は、本明細書の特許請求の範囲によってのみ限定されるものである。

#### 【0021】

##### 【実施例】

〔実施例1〕 N-バニリル-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエンアミド  
〔ドヘバニル(Dohevanil)と記す〕の合成例

バニリルアミンと4,7,10,13,16,19-ドコサヘキサエン酸(C22:6, DHA)とを下記の手順により反応させ、上記ドヘバニルを合成した。

まず、バニリルアミン塩酸塩(ALDRICH製) 1.23gを42℃のぬるま湯5mlに溶解

し、等モル量の10%水酸化ナトリウム水溶液(2.62ml)を加えて、40℃で20分間攪拌した。析出した沈殿を濾別し、冷やした蒸留水で3回洗浄した。濾過残渣を110℃で3時間減圧下で乾燥し、さらに室温で30分間真空乾燥して、バニリルアミン0.801gを得た。

## 【 0 0 2 2 】

該バニリルアミン0.230gと4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸(DOOSAN SERDARY RESEARCH LABORATORIES製)0.591gとをクロロホルム13.8mlに溶解した。次いで、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)(東京化成製)0.310g、ジメチルアミノピリジン(DMAP)(東京化成製)0.037g、及びブチルヒドロキソトルエン(BHT)(東京化成製)を極く少量加えて、室温で42時間攪拌しながら反応させた。反応終了後、濾過して沈殿を除き、濾液をロータリーエバポレータで約0.5mlまで濃縮した。該濃縮液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル40g、展開溶媒:ヘキサン/酢酸エチル=6/4(vol/vol))で分画した。ドヘバニルの画分を集めて、ロータリーエバポレータで濃縮乾固し、次いで真空乾燥して、無色ないし淡黄色のアモルファス状固体としてドヘバニル0.311gを得た。得られたドヘバニルをNMRで分析した結果は下記のとおりであった。

## 【 0 0 2 3 】

$^1\text{H-NMR}$  (200MHz、 $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 0.97$  (3H, t,  $J=7.6\text{Hz}$ ,  $-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 2.1 (2H, m,  $\text{Me}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-$ ), 2.25 (2H, m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 2.4 (2H, m,  $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 2.83 (10H, m,  $-\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}-\times 5$ ), 3.88 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ), 4.35 (2H, d,  $J=2.8\text{Hz}$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ), 5.37 (12H, m,  $-\text{CH}=\text{CH}-\times 6$ ), 5.6 (1H, d,  $J=1\text{Hz}$ ,  $-\text{OH}$ ), 6.82 (3H, m, aromatic proton)

## 【 0 0 2 4 】

〔実施例2〕 N-バニリルミリスチン酸アミド(C14)の合成

特開平第11-206396号に開示されているリパーゼのアシル基置換反応を利用してN-バニリルミリスチン酸アミド(C14)を合成することができる。その手順は、まず、バニリルアミン塩酸塩37.8mg(0.2mmol)を10mMホウ酸緩衝液(pH9.0)10mlに溶解し、そこにノボザイム435(ムコル・ミーハイ由来固

定化酵素：ノボルディスク社製）を 1 0 0 0 mg、ミリスチン酸メチルエステルを 5.8 0 g（2 4 mmol）加えて、攪拌しながら 7 0℃で所定の時間反応させる。その後、生成した N-バニリルミリスチン酸アミドを定量する。用いたバニリルアミンの量を基準とする反応収率は、反応時間 2 4 時間で約 3 0 %、7 2 時間で約 5 7 %になる。

## 【 0 0 2 5】

## 〔実施例 3〕 N-バニリルオレイン酸アミド(C18:1)の合成

ミリスチン酸メチルエステルと同じモル数のオレイン酸メチルを使用した他は、実施例 2 と同様にして合成を行う。その結果、用いたバニリルアミンの量を基準とする反応収率は、反応時間 7 2 時間で約 4 4 %になる。

## 【 0 0 2 6】

## 〔実施例 4〕 N-バニリルリノール酸アミド(C18:2)の合成

ミリスチン酸メチルエステルと同じモル数のリノール酸メチルを使用した他は、実施例 2 と同様にして合成を行う。その結果、用いたバニリルアミンの量を基準とする反応収率は、反応時間 7 2 時間で約 3 9 %になる。

## 【 0 0 2 7】

## 〔実施例 5〕 本発明で用いるバニリル脂肪酸アミドの抗メラノーマ作用

本発明の医薬組成物の抗メラノーマ作用を調べるため、B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞を用いて、実施例 1 のドヘバニルとカプサイシンの効果を比較した。

## (1)細胞及び培養条件

比較に用いた B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞は、マウス由来悪性黒色腫細胞である。該メラノーマ細胞を、10%牛胎児血清、ペニシリン/ストレプトマイシン溶液を含む DMEM 培地 (pH7.2) 中で、37℃及び 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。該細胞が 7 0%~80%コンフルエントに達した後、付着性であるためトリプシン-EDTAで処理して細胞を剥がし、継代を行った。

## 【 0 0 2 8】

## (2)細胞形態の観察

該細胞形態については、光学顕微鏡観察及び蛍光顕微鏡観察を行なった。

該光学顕微鏡観察は、マルチプレートに細胞を播き、所定時間培養後、ニコン

のTMSを用いて観察し、撮影することにより行った。

蛍光顕微鏡観察は、所定時間薬剤処理したB16F10細胞懸濁液( $1 \times 10^6$ 個)をPBS(－)で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した後、該細胞固定液を、PBS(－)で洗浄し、細胞をPBS(－)20  $\mu$ lで懸濁し、スライドガラス上で細胞懸濁液5  $\mu$ lに、蛍光指示薬(Hoechst 33342(1mM))2  $\mu$ lの割合で混合し、カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡下(U領域)で観察、写真撮影することにより行った。

【0029】

### (3) 細胞数測定

細胞を回収し懸濁した後、懸濁液を取り、同量のトリパンブルー染色液を加えて十分に懸濁し、該懸濁液を血球計算盤(ビュルケルチュルク血球計算盤;日本臨床器械工業株式会社)を用いて位相差顕微鏡下で細胞数を測定した。

### (4) 細胞内メラニン定量

細胞を回収しPBS(－)200  $\mu$ lに懸濁後、エタノール/エーテル1mlを添加し15分静置させてから遠心分離を行ない、得られたペレットを10%DMSO-1N NaOH溶液1mlに懸濁した後、80℃で15分間インキュベートし、上清の吸光度を475nmの波長域で測定した。該メラニン量は予め測定しておいた所定のメラノーマ細胞数当たりの吸光度をコントロールを100として相対値で示した。

【0030】

### (5) 官能試験による相対辛味度の決定

カプサイシンとドヘバニルの相対辛味度を、アルコール溶液をカバーガラスに一滴落とし、アルコールを蒸発させてから舌で検知できる最小量から求めた。その結果、カプサイシンを1とするとドヘバニルは $10^{-5}$ であり、ドヘバニルの辛み、刺激性は極めて小さかった。

#### (比較実験)

カプサイシンが該メラノーマ細胞の増殖に及ぼす影響を調べるため、メラノーマ細胞を培養しているDMEM培地に対し、カプサイシンをそれぞれ10  $\mu$ M、30  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M及び300  $\mu$ M添加し48時間培養した後、細胞数を測定した。48時間培養した結果、コントロールに対してカプサイシンは濃度依存的に細胞の増殖を抑制することが観察された。次いで、ドヘバニルの該メラノ

マ細胞に対する影響を調べるため、カプサイシンをドヘバニルに置き換えて、カプサイシンの影響測定と同様に、それぞれ  $10\ \mu\text{M}$ 、 $30\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M}$ 、及び  $100\ \mu\text{M}$  の濃度で培養を行なった。

#### 【0031】

その結果、図1及び図2に示されているように、ドヘバニルは、カプサイシンと同様に濃度依存的に細胞の増殖を抑制するが、その抑制度は明らかにドヘバニルが強い。特に、濃度  $50\ \mu\text{M}$  では、カプサイシンでは細胞数がコントロールの約  $60\%$  なのに対し、ドヘバニルでは約  $10\%$  と低く、濃度  $100\ \mu\text{M}$  では、カプサイシンでは細胞数がコントロールの約  $50\%$  なのに対し、ドヘバニルでは細胞数が  $0\%$ 、すなわち生存率が  $0$  になっている。したがって、ドヘバニルはカプサイシンよりもメラノーマ細胞に対しかなり強い細胞増殖抑制効果を有しているのが判る。

#### 【0032】

カプサイシン濃度  $300\ \mu\text{M}$  と、ドヘバニル  $50\ \mu\text{M}$  の存在下で処理したメラノーマ細胞の細胞形態及びその様子を位相差顕微鏡で観察した。その結果、高濃度のカプサイシンで処理したメラノーマ細胞と比べて、より低濃度のドヘバニル処理で処理したほうが、培養容器に付着している細胞が顕著に減少していることが示された。

カプサイシン、及びドヘバニルによる細胞の死がアポトーシスであるか否かを調べるため、染色体に特異的に結合するHoechst33342を用いて蛍光顕微鏡による核の形態観察を行った。その結果、コントロールと比較してカプサイシン、ドヘバニルのそれぞれの濃度処理において、アポトーシスした細胞に特徴的なクロマチンの凝縮、核の形態の乱れが観察された。このようにカプサイシン及びドヘバニルとも、メラノーマ細胞にアポトーシスを誘導し、特にドヘバニルは強いアポトーシス誘導をすることは明かである。

#### 【0033】

このように、カプサイシンと比べ、本発明の医薬組成物で用いるドヘバニルは、辛み、及び刺激性が著しく弱く、かつアポトーシスを誘導してメラノーマ細胞の増殖を強く阻害することが判った。



## 【実施例 6】 本発明で用いるバニリル脂肪酸アミドの抗腫瘍作用

カプサイシンとドヘバニルとの抗腫瘍作用を比較するため、ヒト子宮頸部癌由来のHeLa細胞を腫瘍細胞とし、NIH/3T3細胞を正常細胞として実験を行なった。実験に用いたこれらの細胞は、5%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地(pH7.2)中で、37℃及び5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。カプサイシン及びドヘバニルをそれぞれ10 μM、30 μM、50 μM、及び100 μMの濃度で加え、各細胞の培養を行なった。該比較実験において、細胞増殖能はWST-1法、及び上清中へのLDH活性放出を指標に測定した。

## 【0034】

その結果、図3から明らかなようにHeLa細胞には、カプサイシン及びドヘバニル双方とも、濃度依存的に細胞増殖を抑制するが、その作用はドヘバニルのほうが強く、特に濃度100 μMになると、カプサイシンでは生存率が50%近いのに対し、ドヘバニルでは生存率が0%になる。一方、図4から明らかなように、カプサイシン及びドヘバニルとも30 μMまではNIH/3T3細胞に対してほとんど影響を与えない。したがって、カプサイシンと比べ、ドヘバニルは辛み、刺激性が著しく低く、同時により高い抗腫瘍効果を有し、かつ正常細胞には影響が少ないことが判る。

## 【0035】

なお、カスパーゼ3活性測定によると、カプサイシン及びドヘバニルともアポトーシスによる細胞死を誘導とすると考えられる。

なお、本実施例のWST-1法とは、ミトコンドリアの還元酵素活性を利用して、フォルマザンを還元させ、その発色を吸光度で測定する方法を言い、細胞が死ぬとミトコンドリアの当該活性が失われるので該吸光度は細胞増殖の指標となる。また、LDH活性放出とは、LDH（乳酸脱水素酵素）が細胞死に伴う細胞膜破壊で細胞外に放出され、細胞外でLDH活性が生じることをいい、該活性の測定値は細胞死の程度の指標となる。

## 【0036】

## 【実施例 7】 本発明で用いるバニリル脂肪酸アミドの抗白血病細胞作用

カプサイシンとドヘバニルとの抗白血病細胞作用を比較するため、ヒト急性白

血病細胞U9 3 7を用いて実験を行なった。該U9 3 7細胞を、5%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地(pH7.2)中で、37℃及び5%CO<sub>2</sub>条件下で培養した。カプサイシン及びドヘバニルをそれぞれ10 μM、30 μM、50 μM、及び100 μMの濃度で加え培養を行なった。該比較実験において、細胞増殖能はトリパンプルー細胞分染法による測定値を指標に検討した。

#### 【0037】

その結果、図5から明らかなように該U9 3 7細胞には、カプサイシン及びドヘバニル双方とも、濃度依存的に細胞増殖を抑制するが、その作用はドヘバニルのほうが強く、特に濃度100 μMになると、カプサイシンでは生存率が50%近いのに対し、ドヘバニルでは生存率が0%になる。したがって、カプサイシンと比べ、ドヘバニルは辛み、刺激性が著しく低く、同時により高い抗白血病細胞増殖抑制効果を有することが判る。また、カスパーゼ3活性測定によると、カプサイシン及びドヘバニルともアポトーシスによる細胞死を誘導すると考えられる。

#### 【0038】

なお、本発明のトリパンプルー分染法とは、トリパンプルーがタンパク質と結合して青色を呈する性質、及び細胞が死ぬと該トリパンプルーを通さない細胞膜の機能が失われ、該トリパンプルーが細胞内に進入するという性質を利用した方法であって、死んだ細胞はトリパンプルーで青く染まるので、染まった細胞を顕微鏡下で数えることでその生存率を測定することができる。

#### 【0039】

〔実施例8〕 ドヘバニルの構成要素となっている各化合物のB16メラノーマ細胞に対する影響

検討する各化合物の濃度を100 μMとし、48時間処理、培養した他は実施例5と同じ方法で、ドヘバニルの構成要素となっている各化合物のB16メラノーマ細胞に対する影響を検討した。すなわち、カプサイシン、ドヘバニル、バニリルアミン、DHAで単独添加処理した場合と、DHAと、カプサイシン又はバニリルアミンとを同時添加して処理をした場合を比較して、各化合物の細胞増殖への影響を調べた。図6に示すように、DHAと、カプサイシン又はバニリルアミンとを同

時添加して処理した場合は、ドヘバニルのような顕著な細胞増殖抑制はみらなかった。したがって、ドヘバニルの効果は、カプサイシン又はバニリルアミンとDHAとの単なる相加効果によるものではないことが示された。

【0040】

【発明の効果】

本発明は、抗腫瘍性、特に抗メラノーマ及び抗白血病作用を有する抗腫瘍医薬組成物を提供する。特に本発明は、カプサイシン同様、正常細胞に対する副作用が小さく、かつ高い抗腫瘍作用、特に抗メラノーマ及び抗白血病作用を有し、さらにカプサイシンのような辛さ、刺激性、及び炎症誘発性が極めて少ない抗腫瘍医薬組成物を提供する。

なお、本発明のバニリル脂肪酸アミドの関連化合物であるカプサイシンは、In VitroとIn Vivoともに抗腫瘍作用があり、それぞれのデータ間に相関関係があることが報告されている (Eur J. Cancer. 1996 Oct.; 32A(11):1995-2003)。一方、本発明のバニリル脂肪酸アミド及びカプサイシンはともにアポトーシスを誘導して腫瘍細胞の増殖抑制効果を発揮すること、及び生体内レセプターであるバニロイドレセプターに結合するバニリルアミン構造を有する (A. Szallasi et. al., Life Sci., 47, 1399-1408 (1990))。この点を考慮すると、本明細書は、In Vivoデータは記載していないが、当業者であれば本発明の医薬組成物は、In Vivoにおいても効果を発揮することが明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、B16F10メラノーマ細胞に対するカプサイシンの影響を示すグラフである。

【図2】 図2は、B16F10メラノーマ細胞に対するドヘバニルの影響を示すグラフである。

【図3】 図3は、HeLa細胞に対する、カプサイシン及びドヘバニルの影響を示すグラフである。

【図4】 図4は、NIH/3T3細胞に対する、カプサイシン及びドヘバニルの影響を示すグラフである。

【図5】 図5は、急性白血病細胞U937に対するカプサイシン及びドヘバニ

ルの影響を示すグラフである。

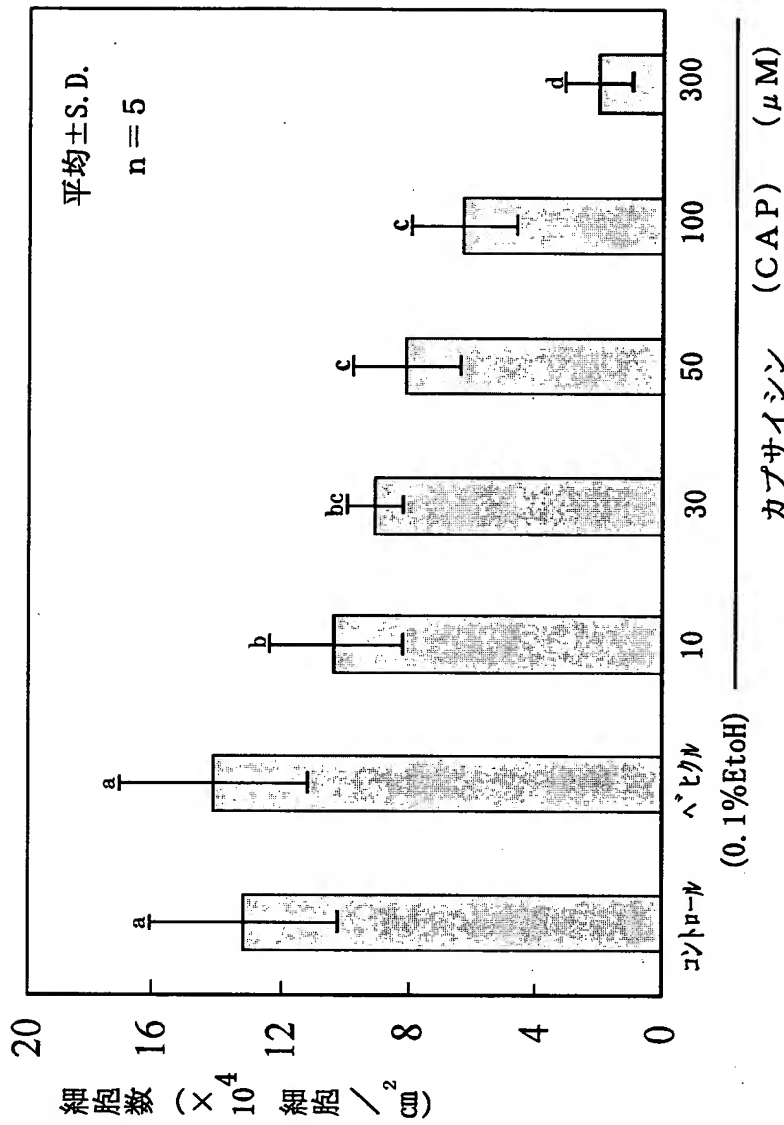
【図 6】 図 6 は、ドヘバニルの構成要素となっている各化合物の B16メラノーマ細胞に対する影響を示すグラフである。

【書類名】

図面

【図 1】

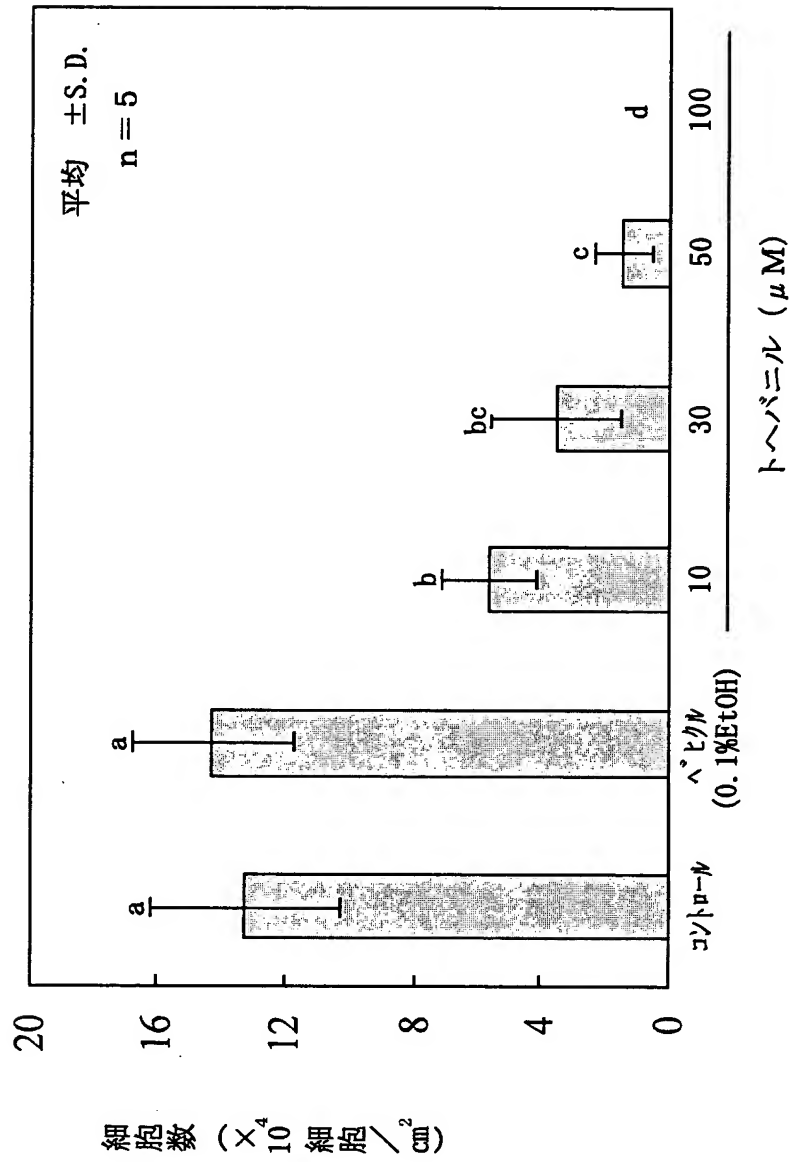
図 1



B16F10メラノーマ細胞の細胞生存率に対する

カプサイシンの効果

【図 2】

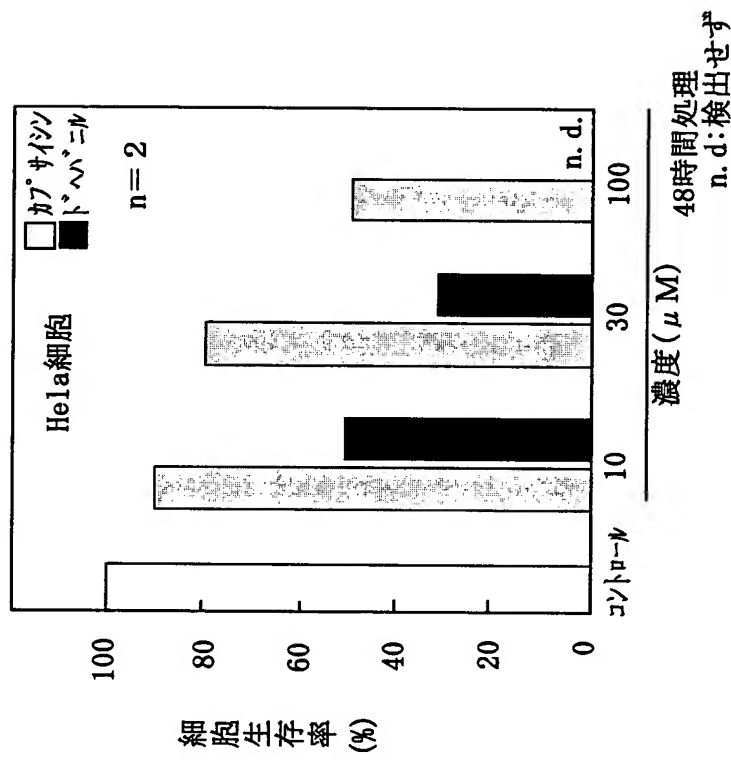


B16F10メラノーマ細胞の細胞生存率に対する  
ドヘパニルの 効果

図 2

【図 3】

図 3

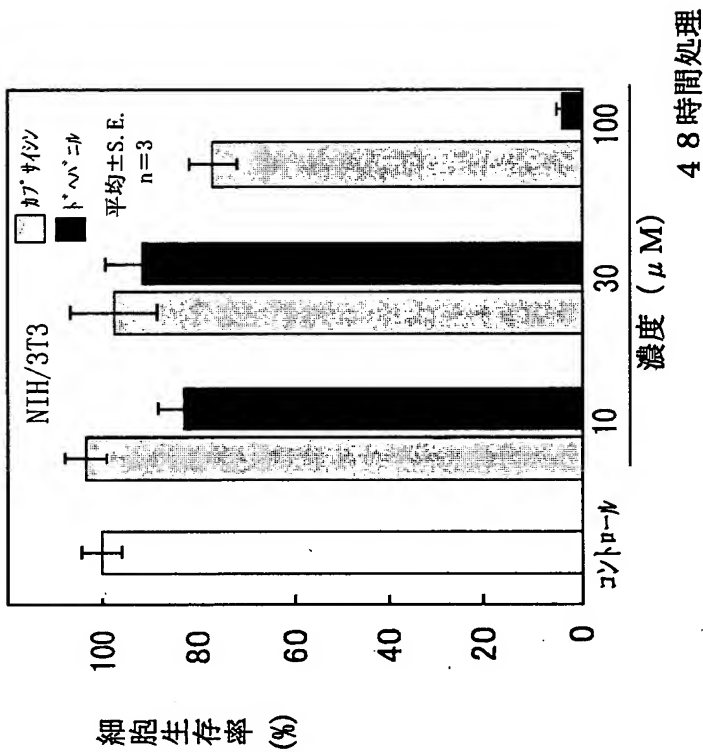


HeLa細胞の生育に対するカプサイジンと

ドヘバニルの効果

【図 4】

図 4

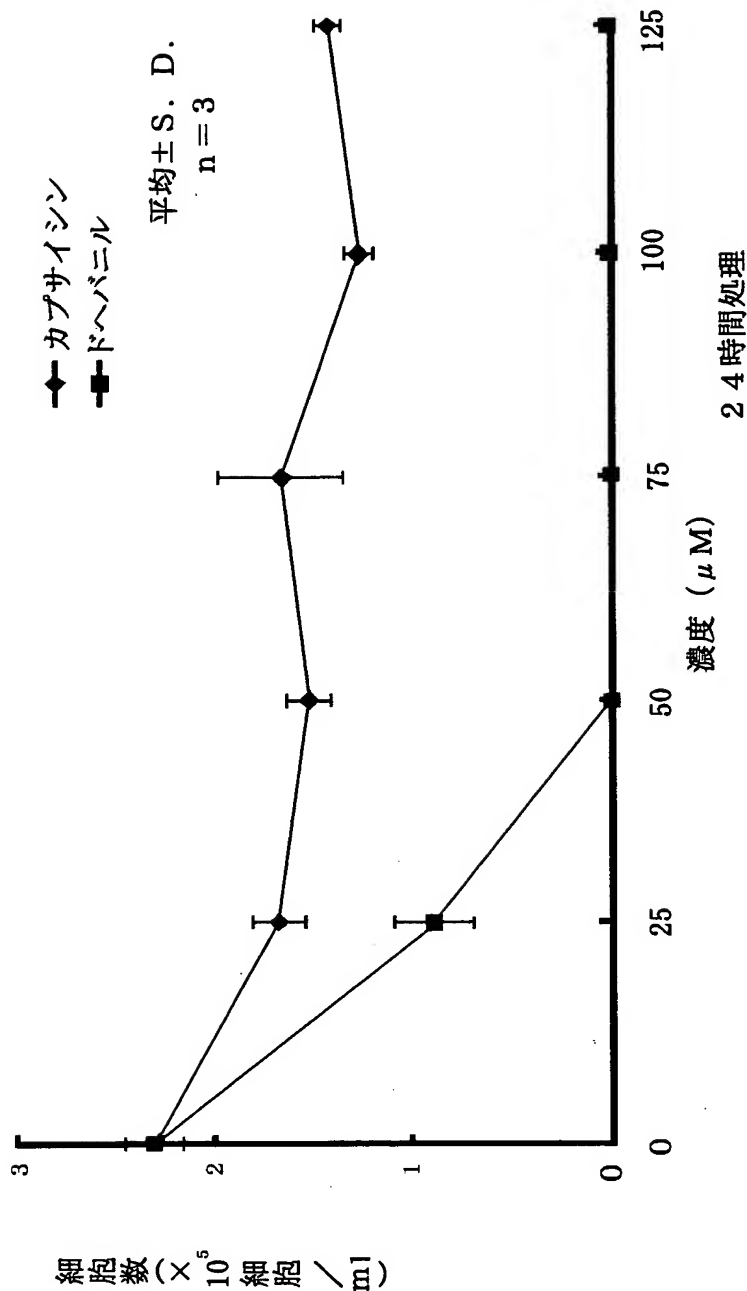


NIH/3T3細胞の生育に対する  
カプサイシンとトバコロールの効果



【図 5】

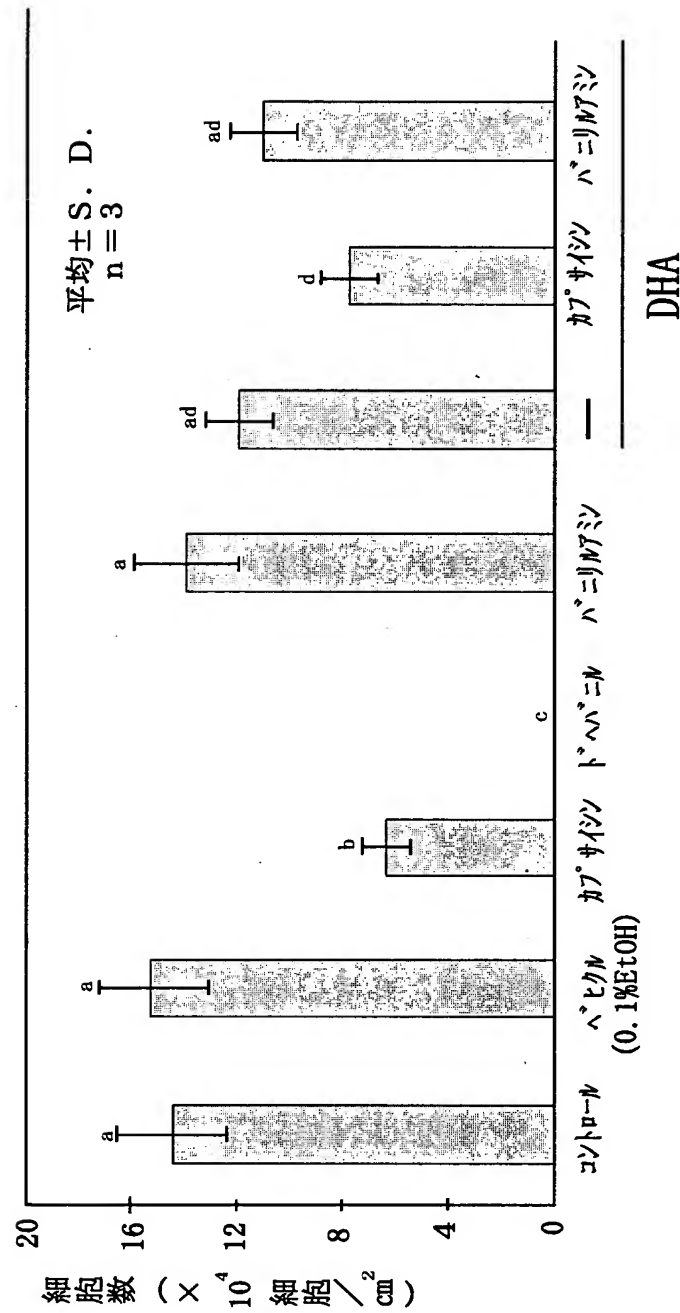
図 5



U937細胞の細胞生育に対するカプサイシン又は  
ドヘパニルの効果

【図 6】

図 6



100  $\mu$  Mで48時間処理

B16F10メラノーマ細胞の細胞生存率に

対する、カプサイシン、DHA及びカプサイシン 関連化合物の効果

【書類名】 要約書

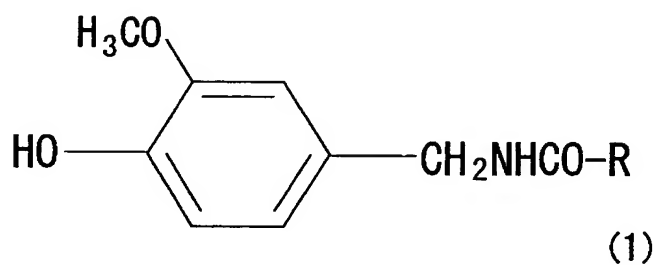
【要約】

【課題】 低副作用で、かつ高抗腫瘍作用を有する抗腫瘍医薬組成物を提供する

。

【解決手段】 下記化学式(1)で表されるバニリル脂肪酸アミドを含む、抗腫瘍医薬組成物：

【化 7】



（式中-CO-R基は、炭素原子数 1 4 個～3 2 個の飽和脂肪酸残基、又は炭素原子数 1 4 個～3 2 個の不飽和脂肪酸残基）。

【効果】 低副作用で、かつ高抗腫瘍作用、特に抗メラノーマ作用及び抗白血病作用を有し、辛さ、刺激性、及び炎症誘発性などが極めて少ないカプサイシン関連成分のバニリル脂肪酸アミド化合物を含む抗腫瘍医薬組成物が得られた。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001100]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋堀留町1丁目9番11号  
氏 名 呉羽化学工業株式会社